Istituto di Medicina Operativa della Regia Università di Palermo

Ricerche istochimiche sulle sostanze lipoidi degli elementi morfologici del sangue

PER IL

Dott. N. BARBARO

Capitano Medico

II Comunicazione - I lipoidi dei leucociti

MILANO
CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta, N. 48.

1914

Istituto di Medicina Operativa della Regia Università di Palermo

Ricerche istochimiche sulle sostanze lipoidi degli elementi morfologici del sangue

PER IL

Dott. N. BARBARO

Capitano Medico

MILANO
CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta, N. 48.

1914

Estratto dalla *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche*
N. 113 — Anno 1914

Stab. della Casa Edit. Dr. F. VALLARDI, Milano.

La presenza di sostanze lipoidi nei leucociti è stata microchimicamente dimostrata da parecchi Autori:

Aschoff (1) trovò granulazioni grasse nei leucociti del neonato.

Guyot avea, fin dal 1905, messo in evidenza, in preparati di sangue essiccato su vetrini, dei leucociti dall'aspetto bollicinoso, dovuto a supposti vacuoli protoplasmatici e che egli interpretò come forme degenerative. Tale aspetto vescicolare è, con ogni probabilità, da attribuirsi a sostanze grasse disciolte.

Ma lo studio delle sostanze grasse nei leucociti ebbe un considerevole impulso in seguito alle ricerche di Cesaris Demel.

Questo Autore, nel 1906, constatò con la colorazione vitale la presenza di sostanze grasse nei leucociti del sangue circolante e degli organi emopoietici. E distinse, come è noto, due specie di leucociti sudanofili:

a) Alcuni con nucleo normale e fini granulazioni sudanofile.

b) altri con nucleo mal tingibile, con granulazioni sudanofile grossolane e numerose.

Diede a questi ultimi il nome di corpuscoli purulenti.

Molti studiosi confermarono in seguito le osservazioni di Cesaris Demel e portarono specialmente la loro attenzione sulla maniera di comportarsi dei leucociti sudanofili in molte forme morbose umane e specialmente riprodotte sugli animali.

Ricordo Buttino e Quarelli ed il loro pregevole metodo di colorazione a secco; Torri, Cinotti, Comessatti, De Marchis, Romanelli, Michieli, M. e G. Schifone, Biondi e Galassi, Benini, Facchini e Milani, Pozzilli (2), Tommasi Crudeli, ecc.

Quasi tutti questi Autori accettarono la distinzione di due specie di leucociti sudanofili, ammessa da Cesaris Demel.

Ciaccio (3), applicando i suoi noti metodi allo studio dei leucociti, concluse:

a) che in condizioni normali si possono riscontrare scarsi granuli di natura lipoide nei leucociti.

b) che essi aumentano considerevolmente in condizioni patologiche.

Tale aumento può, secondo il suddetto Autore, esser dovuto o a processo infiltrativo, o a processo degenerativo.

Kawamura (4) accennò alla presenza di gocciole birefrangenti (eteri di colesterina?) in alcuni leucociti mononucleati nel diabete.

D'Agata (5) fece menzione di leucociti a granulazioni lipoidi colorabili col metodo Ciaccio nell'intossicazione difterica sperimentale del coniglio.

Spadaro (6), recentissimamente, dimostrò le granulazioni grasse dei leucociti mettendole in evidenza coi vapori di tetrossido di Osmio (leucociti osmiofili).

Gli Autori che hanno studiato tale importante argomento si sono per la maggior parte accordati su questi due concetti fondamentali:

1.° Esistono leucociti a contenuto grassoso denominati sudanofili od osmiofili (secondo che son messi in evidenza col Sudan III o con l'Osmio).

2.° Di tali leucociti esistono 2 varietà:

a) leucociti a piccole granulazioni.

b) leucociti a grosse granulazioni e più ammassate.

Di qual natura siano i grassi che costituiscono le granulazioni suddette noi non sapevamo dettagliatamente: mi son perciò prefisso il compito di determinarla.

La tecnica ed i metodi da me adoperati furono altrove dettagliatamente descritti (V. *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche* del 31 maggio c. a. N. 65) e superfluo sarebbe quindi ripeterli.

Solo voglio qui aggiungere che la fissazione del sangue ai vapori di formalina si può sopprimere e farla direttamente in liquido formio-bicromico con le descritte modalità.

Col metodo da me adoperato, si hanno preparati nitidissimi e di durata indefinita: si possono contemporaneamente da essi ricavare la formola leucocitaria ed il quadro di Arneth.

* * *

Le sostanze grasse nei leucociti possono essere considerate dal punto di vista *morfologico*, *topografico* e *microchimico*.

1.° *Morfologia.*

a) Per quel che riguarda la *grandezza*, ho notato oscillazioni più o meno rilevanti, da granuli puntiformi, sottili quasi al limite della visibilità microscopica a quelli intermedii di un granulo neutrofilo od eosinofilo, fino a grandezze relativamente rilevanti di circa 2 μ. Non ho, fin'ora, visto gocciole di maggiori dimensioni.

b) Indipendentemente dalla grandezza, il *numero* varia molto, da 1 granulo a numerosissimi, fino ad infarcire qualche volta il protoplasma.

2.° *Topografia.*

Si trovano *quasi sempre* nei *leucociti polinucleati neutrofili*, *rarissimamente* nei *mononucleati* e negli *eosinofili;* ed in entrambe queste ultime forme, quando esistono, sono assai scarsi.

In quanto alla *distribuzione* nell'interno della cellula, ho notato che essi sono *sempre* protoplasmatici; qualche volta sembrerebbero endonucleari, ma, osservando attentamente, si rileva in modo indubbio che essi sono sovrapposti al nucleo o situati nelle ripiegature nucleari.

Sono, senza regola fissa, sparsi su tutto il territorio protoplasmatico; non si osservano nell'exoplasma.

3.° *Microchimica.*

In base ai metodi microchimici esposti nel mio precedente lavoro succitato, si possono così classificare i diversi granuli:

a) Granuli costituiti prevalentemente di *eteri*, ordinariamente di dimensioni medie, raramente grossi, che si colorano facilmente col Sudan III coi processi fin'ora in uso: (Buttino e Quarelli, Cesaris Demel). Col Nil-blau assumono una tinta viola, o rossastra, o bleu-viola; negativi col metodo Fischler, dànno, o no, la lacca cromo-ematossilinica con lo Smith-Dietrich; appaiono come vacuoli col metodo Ciaccio; e con l'Osmio, dopo cromizzazione, assumono la tinta grigia o grigio-bruna.

Ciò fa pensare che le gocciole ed i granuli, anzicchè di *eteri di glicerina puri,* possano essere costituiti da *miscele di eteri di glicerina con colesterina, o di eteri di colesterina,* i quali, del resto, dovrebbero trovarsi in quantità molto scarsa, perchè mai ho notato birefrangenza.

b) Si trovano inoltre granuli di natura *lipoide* in senso stretto, e cioè che si comportano nettamente positivamente col metodo Ciaccio, anche dopo brevissima cromizzazione (24 ore in liquido formio-bicromico) e con lo Smith-Dietrich; negativamente col Fischler, si colorano meno rapidamente col Sudan III, assumono col Nil-blau una tinta bleu o bluastra, non riducono affatto l'Osmio dopo cromizzazione.

Queste formazioni si possono presentare sotto tutte le grandezze, da infinitamente piccole alle più grosse.

Dai caratteri microchimici suddetti si rileva che esse sono costitute da *fosfatidi*.

c) Finalmente si trovano formazioni *miste*, ben visibili e identificabili col metodo Ciaccio. Esse si presentano come gocciole il cui contorno, più o meno spesso, totale o parziale, resiste ai solventi e si colora col Sudan III, mentre il resto appare come un vacuolo: si han così immagini assai eleganti, a semiluna, ad anello.

* * *

È possibile da quel che ho rilevato individualizzare dei tipi cellulari?

A me pare che dalle mie numerose osservazioni si possa desumere la seguente classificazione dei leucociti in parola:

1.° *Leucociti lipofori.*
2.° *Leucociti lipoidofori.*
3.° *Leucociti lipo-lipoidofori.*

Tutte queste forme, e con varia prevalenza di qualcuna sulle altre, io ho potuto constatare in casi di pulmonite crupale, di piemia, di tifo, di empiema ecc.

Stabilita così una formola emo-lipoide, da questa potranno in seguito, con ricerche sistematiche, sorgere forse ulteriori utili applicazioni diagnostiche e prognostiche.

* * *

Da quanto ho brevemente esposto, si vede che i miei reperti corrispondono in parte, e solo dal punto di vista morfologico, a quelli degli Autori che mi hanno preceduto.

Mi sembra però assai probabile che un certo numero di granuli e gocciole grasse siano sfuggite ai metodi fin'ora adoperati (Cesaris Demel, Buttino e Quarelli ecc.): infatti io stesso,

facendo un confronto tra i risultati ottenuti con questi metodi e quelli ottenuti coi miei, ho notato quasi sempre un vantaggio numerico in questi ultimi.

Ciò, io credo, potrebbe così spiegarsi: Il Sudan III colora facilmente i grassi comuni, i quali, d'altra parte, resistono bene ai reattivi, mentre i fosfatidi facilmente si emulsionano o si sciolgono in liquidi acquosi e si colorano con difficoltà coi reattivi dei grassi. Sono perciò d'avviso che, coi metodi fin'ora impiegati, si mettono in evidenza specialmente i granuli o le gocciole costituiti da eteri di glicerina, associati, o non, a colesterina, e da eteri di colesterina; mentre sfuggono facilmente quelli costituiti da fosfatidi.

Adoperando poi l'Osmio, si può andare incontro ai seguenti inconvenienti:

1) È impossibile in qualche caso distinguere una granulazione specifica da una grassa, perchè non tutte le granulazioni grasse sono ridotte dall'Osmio.

2) Certe sostanze grasse (eteri di colesterina) dopo l'azione dell'Osmio si sciolgono ancora in alcuni solventi organici, come lo xilolo; sicchè, includendo in balsamo xilolico, alcune gocciole si sciolgono.

3) L'Osmio può ridurre anche sostanze non grasse, purchè contengano un legame multiplo nella loro costituzione (neurina, cisteina, adrenalina ecc.).

* * *

Qual'è l'origine ed il significato dei leucociti sudanofili?

Essi, fin dalle prime osservazioni, furono da alcuni ritenuti come elementi in *fagocitosi;* da altri come elementi in *degenerazione;* da molti, infine, fu ammessa *l'una e l'altra origine.*

Qualcuno ha ottenuto, infatti, un marcato numero di sudanofili in individui sottoposti ad iniezioni di sostanze grasse, o ad alimentazione grassa (De Marchis); altri hanno affermato che si possono ottenere con la somministrazione di sostanze steatogene, come il fosforo, l'arsenico, l'antimonio, alcune tossine ecc. (Biondi e Galassi, Cinotti).

E la differenza tra le due specie, (elementi in fagocitosi ed elementi in degenerazione) è veramente notevole: la 1ª rappresenterebbe elementi in piena vitalità, la 2ª elementi in fase regressiva.

Nel 1° caso (fagocitosi) le sostanze grasse sarebbero di *origine esogena;* nel 2° (degenerazione) di *origine endogena.*

La presenza di grassi e lipoidi nei leucociti si connette ad una questione generale riguardante l'origine dei grassi endocellulari. Generalmente essi possono trovarsi o perchè provengono dall'esterno, o perchè provengono da sostanze lipoidi endocellulari dimostrabili chimicamente, ma non visibili coi nostri mezzi microchimici perchè in combinazione con altre sostanze.

Per distinguere gli uni dagli altri non abbiamo altro criterio che quello riguardante la struttura degli elementi cellulari che li contengono: stato del nucleo e del protoplasma con i suoi costituenti.

In molti leucociti a granulazioni grasse mancano alterazioni profonde della struttura, ed in tali casi é verosimile che le sostanze grasse siano di origine esogena.

Data questa ipotesi dovremmo stabilire:

1) La località in cui queste sostanze vengono assunte.
2) L'eventuale loro ulteriore metabolismo.

È possibile che le sostanze grasse siano assunte o dal plasma sanguigno o dai tessuti di origine (emopoietici).

A risolvere tale questione sarebbe opportuno istituire ricerche sui tessuti emopoietici e specialmente sul midollo osseo.

Circa il loro metabolismo, é possibile che le sostanze grasse, penetrate nei leucociti, subiscano modificazioni; ciò si potrebbe arguire dall'osservazione di leucociti contenenti gocciole di grasso le quali alla periferia presentano una costituzione differente che al centro. In tali casi si tratterebbe di una vera *lipoidosi anabolica* nel senso di Ciaccio (7). Quale sia il significato biologico di essa non è possibile dire con sicurezza: forse potrebbe essere in rapporto con fenomeni immunitarî, nei quali, come è noto, i leucociti hanno un ufficio assai importante.

In altri leucociti a granulazioni grasse troviamo alterazioni più o meno gravi a carico del nucleo, e perciò non si può escludere che le sostanze grasse possano essere di origine endogena, autolitica (lipoidosi degenerativa); per quanto anche in questo caso si possa ammettere che i leucociti sovraccarichi di sostanze grasse assunte dall'esterno, vadano incontro a fenomeni degenerativi.

N. B. Nel precedente lavoro, dallo stesso titolo, pubblicato sulla « Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche » del 31 maggio c. a. n. 65, I Comunicazione — allo specchio ove è detto: *Fosfatidi saturi ed insaturi* — metodo Smith-Dietrich, leggere (al posto dei trattini — —): idem idem: Si comportano, cioè, *positivamente* col metodo Smith-Dietrich.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Aschoff*. Citato da D'Agata (v. appresso). — (2) Per tutti i precedenti Autori le indicazioni bibliografiche sono largamente riportate da: *Torri*. Il Policlinico Sez. Med. gennaio 1908. *Pozzilli*: Il Policlinico Sez. Med. agosto 1908. — (3) *Ciaccio*: Sui lipoidi dei leucociti. — *Kawamura*. Die Cholesterinesterverfettung, Jena, Fischer 1911. — (5) *D'Agata*. Perturbazioni del metabolismo dei grassi. Mattei e Speroni, Pavia. — (6) *Spadaro*. Di un « metodo di elezione » per la ricerca e l'esame dei leucociti a contenuto grassoso considerati come elementi semiologici Giorn. di Med. Mil. giugno-luglio 1913. — *Id. Id.* I leucociti a granulazioni grasse (osmiofili) ed il loro valore semiologico in rapporto alle infezioni purulente e ad altre infezioni. La Clin. Chir. marzo 1914. — (7) *Ciaccio*. Biologie Medicale 1912.